

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-277085

(43)Date of publication of application : 04.10.1994

(51)Int.Cl.

C12P 19/14

(21)Application number : 05-070465

(71)Applicant : TAITO KK

(22)Date of filing : 29.03.1993

(72)Inventor : NAKAJIMA KOICHI  
ITO WATARU

## (54) PRODUCTION OF LOW-MOLECULAR WEIGHT BRANCHED BETA-1,3-GLUCAN AND BRANCHED LAMINARIOLIGOSACCHARIDE

### (57)Abstract:

PURPOSE: To provide a method for obtaining a low-molecular weight branched  $\beta$ -1,3-glucan while retaining a basic structure of the original branched  $\beta$ -1,3-glucan by selectively hydrolyzing the original branched  $\beta$ -1,3-glucan and a method for producing a branched laminarioligosaccharide.

CONSTITUTION: This method for producing a low-molecular weight branched  $\beta$ -1,3-glucan and/or branched laminarioligosaccharide of tri- to octa-saccharides comprises leading a high-order structure of branched  $\beta$ -1,3-glucan having a triple helical structure to at least partially a random state and then obtaining the objective low-molecular weight branched  $\beta$ -1,3-glucan by allowing an end type  $\beta$ -1,3-glucanase to act on the branched  $\beta$ -1,3-glucan of the random state.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 22.02.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-277085

(43) 公開日 平成6年(1994)10月4日

(51) IntCl.<sup>5</sup>

C 1 2 P 19/14

識別記号

庁内整理番号

Z 7432-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平5-70465

(22) 出願日 平成5年(1993)3月29日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成4年10月10日  
社団法人日本生物工学会発行の「平成4年度日本生物工  
学会大会講演要旨集」に発表

(71) 出願人 000204354

台糖株式会社

東京都中央区日本橋大伝馬町7番5号

(72) 発明者 中島 光一

兵庫県神戸市須磨区須磨寺町4丁目5番8  
-206号

(72) 発明者 伊藤 渡

兵庫県加古川市野口町野口356-6

(74) 代理人 弁理士 中村 稔 (外7名)

(54) 【発明の名称】 低分子量分岐 $\beta$ -1, 3-グルカン及び分岐ラミナリオリゴ糖の製造方法

(57) 【要約】

【目的】 分岐 $\beta$ -1, 3-グルカンを選択的に加水分解して分岐 $\beta$ -1, 3-グルカンの基本構造を保持したまま低分化できる方法および分岐ラミナリオリゴ糖の製造方法を提供すること。

【構成】 3重らせん構造を有する分岐 $\beta$ -1, 3-グルカンの高次構造を少くとも部分的にランダム状態に導いた後、エンドタイプの $\beta$ -1, 3-グルカナーゼを用させて低分子化させることを特徴とする低分子量分岐 $\beta$ -1, 3-グルカン及び/又は3から8糖の分岐ラミナリオリゴ糖の製造方法。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 3重らせん構造を有する分岐 $\beta$ -1, 3-グルカンの高次構造を少くとも部分的にランダム状態に導いた後、エンドタイプの $\beta$ -1, 3-グルカナーゼを作用させて低分子化させることを特徴とする低分子量分岐 $\beta$ -1, 3-グルカンの製造方法。

【請求項2】 3重らせん構造を有する分岐 $\beta$ -1, 3-グルカンの高次構造を少くとも部分的にランダム状態に導いた後、エンドタイプの $\beta$ -1, 3-グルカナーゼを作用させて低分子化させることを特徴とする3から8糖の分岐ラミニナリオリゴ糖の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、抗腫瘍活性を有する低分子量の分岐 $\beta$ -1, 3-グルカン及び分岐ラミニナリオリゴ糖の製造方法、特に分岐 $\beta$ -1, 3-グルカンの3重らせん高次構造を保持した低分子量の分岐 $\beta$ -1, 3-グルカン及び分岐ラミニナリオリゴ糖を製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】低分子量 $\beta$ -1, 3-グルカン及びラミニナリオリゴ糖には、有用な生化学的や医薬的性質を有することが報告されているように、これらの糖には幅広い用途が期待されている。具体的には、このような有用な性質として、例えば、分岐 $\beta$ -1, 3-グルカンは強い免疫賦活作用を有し、抗腫瘍効果（臨床免疫17 (Suppl. 9) 200~217, 1985）、抗ウイルス効果（近大医誌、第6巻3号387~391, 1981）、傷の修復効果（JOURNAL OF THE RETICULOENDOTHELIAL SOCIETY 27 (1), 1980）など広範な活性を有することが知られている。また、それら多糖の構成単位である分岐オリゴ糖には、ラットの成長と腸内細菌叢に対する影響（土橋昇、渡辺智子ら、千葉県立衛生短期大学紀要 Vol 7, No. 2 P 33-41 (1988)）や植物エリクター活性の増加、硫酸化ラミニナリオリゴ糖の低副作用抗エイズ効果（生島直也、東海林忠生ら、高分子学会予稿集 Vol 39, No 8 P 2757-2759 (1990)）等が知られている。また、これらの分岐オリゴ糖はその多糖の構造解析や生理活性の発現メカニズムの解明など基礎的研究への応用面で有効である。これらラミニナリオリゴ糖の調製は、 $\beta$ -1, 3-グルカンまたは分岐 $\beta$ -1, 3-グルカンの酸による部分加水分解や酵素（J. Ferment Technol Vol 63 No 1 P 61-66 (1985)）による加水分解等により得られることが知られている。また、グルコースホスホリラーゼの転移反応（Agric Biol Chem Vol 55 No 5 P 1431-1432 (1991)）や有機合成法によって得られることも知られている。

【0003】従来の分岐 $\beta$ -1, 3-グルカンの分解方法として、酸加水分解法、超音波照射法（Carbohydrate

2

Research, 89 (1981) 121-135）、高速噴射法（Agric. Biol. Chem. 48 (4) 915~921, 1984）、 $\gamma$ 線照射法（日本農芸化学会誌66巻11号 1633~1640, 1992）及び酵素加水分解法など各種の方法が知られている。これらのうち超音波照射法、高速噴射法、 $\gamma$ 線照射法では高分子体の低分子化には有効であるが、通常これらの低分子化方法では多糖の高次構造は破壊される場合が多く、もとの多糖がもっている3重らせん高次構造を保持した分子量20万から1万の低分子量体を調製するのは非常に困難である。また、オリゴ糖の調製には長時間の処理が必要であり、短期間の処理では物理的に困難である。酸加水分解法では分岐 $\beta$ -1, 3-グルカンが無秩序に加水分解されるので、特定の分岐オリゴ糖を得るのが難しい。酵素加水分解では得られるオリゴ糖は主にグルコース、ラミニナリオース、ゲンチビオースであり、それ以上の重合度を持つオリゴ糖や分岐オリゴ糖の調製は非常に困難である。従って、これまでの低分子化方法では特定の3重らせん構造を有する低分子量 $\beta$ -1, 3-グルカンおよび特定の結合を有する分岐オリゴ糖を大量に調製することが困難であるため、このような低分子量グルカンおよび分岐ラミニナリオリゴ糖の性質やこれらの糖を用いた構造研究などに関する基礎的研究は殆ど行われていないのが実情であり、これらの糖の簡便で効率のよい製造方法の開発が望まれている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、分岐 $\beta$ -1, 3-グルカンを選択的に加水分解して分岐 $\beta$ -1, 3-グルカンの基本構造を保持したまま低分化できる方法および分岐ラミニナリオリゴ糖の製造方法を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明は、分岐 $\beta$ -1, 3-グルカンの高次構造である3重らせん構造をランダム構造にすると、これまで殆ど反応しなかったエンドタイプの $\beta$ -1, 3-グルカナーゼに対する基質親和性が増加し、該グルカナーゼが $\beta$ -1, 3-結合のある一部分を特異的に効率よく加水分解し、分岐 $\beta$ -1, 3-グルカンの3重らせん高次構造を保持した低分子量の分岐 $\beta$ -1, 3-グルカンを製造することができ、同時に特定の構造を持つ3糖以上の分岐ラミニナリオリゴ糖を短時間でしかも大量に製造できるとの知見によりなされたのである。すなわち、本発明は、3重らせん構造を有する分岐 $\beta$ -1, 3-グルカンの高次構造を少くとも部分的にランダム状態に導いた後、エンドタイプの $\beta$ -1, 3-グルカナーゼを作用させて低分子化させることを特徴とする低分子量分岐 $\beta$ -1, 3-グルカンの製造方法及びこの反応において副生する分岐ラミニナリオリゴ糖の製造方法を提供する。

【0006】本発明に使用できる基質は、 $\beta$ -1, 3-

3

グルカン類で特に制限はなく、自然界に存在するものは勿論のこと、培養により得られるグルカンも任意に用いられ、例えばシゾフィラン、カードラン、パラミロン、スクレログルカンなどで分離精製したもの以外に培養プロセスでも利用することが出来る。また、本発明に使用できる酵素は、市販のエンドタイプの $\beta$ -1, 3-グルカナーゼ活性を有する酵素は勿論のこと培養により得られるエンドタイプの $\beta$ -1, 3-グルカナーゼ活性を有するものであれば利用できる。市販のエンドタイプの $\beta$ -1, 3-グルカナーゼ活性を有する酵素としては、例え

【0007】以下に、シゾフィランを基質としザイモリアーゼの酵素反応を利用する製造法について説明する。まず、基質である該多糖の高次構造を3重らせん構造から少なくとも部分的にランダムコイルに導く。これは、例えば、0.1N以上の水酸化ナトリウムや水酸化カリウム等のアルカリ溶液、DMSO等の有機溶剤或は尿素等の水素結合破壊剤を用いることにより行うことができる。そして、アルカリ溶液を用いた場合には、その後、酸により中和して少なくとも部分的にランダムコイルの多糖溶液を得ることができる。又、DMSO等の有機溶剤を添加した場合にはアルコール、アセトン等水混和性の有機溶剤を用いて多糖をランダムコイルのまま沈殿させると同時に、溶媒として用いたDMSO等の脱有機溶剤後、沈殿物を水に再溶解することにより少なくとも部分的にランダムコイルの多糖溶液を調製することが出来る。また、多糖の溶液を加熱処理、例えば130℃以上150℃以下の温度で処理を行うことによって3重らせん構造をランダムコイルに変化させることができる。

【0008】この様にして得られたランダムコイル多糖溶液は、2%以上の高濃度の場合ゲル状でそれ以下の低濃度では粘度の高い溶液となる。この溶液にザイモリアーゼを作用させて酵素反応を行わせ、例えば1時間でこれらの粘稠な溶液は低粘度の溶液に変化し目的の低分子量シゾフィラン及び分岐ラミナリオリゴ糖を得ることが出来る。酵素反応は35~45℃で行うのが好ましい。図1に調製した分岐オリゴ糖画分のHPLCチャートを示したが3糖、4糖を中心に8糖まで確認することが出来る。また、未分解の多糖は、元の分子量と比較して1/2~1/100以下の分子量にシフトすることもわかった。こうして得られた酵素反応液より、目的とする低分子量の多糖或は分岐ラミナリオリゴ糖は、UF膜処理やエタノールなどの有機溶剤による沈澱分離法により簡単に分離することが出来る。低分子量体はその分子量が60万から1万までの混合物であるが、アセトンやアルコールによる分子量分別沈澱により簡単に、分子量分画を行うことができる。また、低分子量体は、再度酵素処

4

理することにより全てをオリゴ糖に導くことが出来る。集めたオリゴ糖は、活性炭カラムクロマト分離、ゲルろ過カラムクロマト分離、ODSカラムクロマト分離により純度90%以上に精製できる。また、糖液を水またはアルコール-水の2溶媒系で結晶化する事により更に高純度標品に導くことが出来る。

【0009】クロマト分離により精製したオリゴ糖の構造は、箱守法によるメチル化及び還元末端を還元後箱守法によるメチル化を行い、TFAによる加水分解後還元しアセチル誘導体に導きS1188キャピラリーカラムでガスクロマト分析を行った結果、構成糖はグルコースでその構造式は図2に示すものであることが分かった。また、還元末端をピリジルアミノ化後ODSカラムによるHPLC分析の結果、図2の構造に間違いのないことを確認し、その純度は100%であった。また、このようにして得られた分子量約20,000の多糖は、コンゴレッドとの錯体形成および熱容量測定により3重らせん構造を保持していることが確認された。以上のようにして、本発明によれば分子量600万以上の分岐 $\beta$ -1, 3-グルカンから、分岐 $\beta$ -1, 3-グルカンの3重らせん構造を保持したまま分子量10万以下の低分子量分岐 $\beta$ -1, 3-グルカン及び3~8糖の分岐ラミナリオリゴ糖を得ることができる。さらに、エタノール分別沈殿やゲル濾過分画を行い、分子量80,000~20,000の任意の分子量のものを得ることもできる。次に実施例により本発明を説明する。

#### 【0010】

##### 【実施例】

##### 実施例1

シゾフィラン (分子量60万) 1gを0.2N水酸化ナトリウム溶液20mlに完全に溶解してシゾフィラン溶液を得た。このシゾフィラン溶液を0.1N塩酸溶液40ml中に攪拌しながら添加し、添加後pH6に調整し全量を100mlとした。この溶液にザイモリエース-20T (生化学工業製) を2.5mg加えて溶解し40℃~45℃で攪拌しながら10時間反応させた。得られたもののHPLCチャートを図1に、又その構造式を図2に示す。

##### 比較例

シゾフィラン1gをpH6のリン酸緩衝液100mlに溶解し、ザイモリエース-20Tを2.5mg加え溶解後、40℃~45℃で攪拌しながら10時間反応させた。実施例1及び比較例で得られた反応液1mlを反応の所定時間ごとに採取後煮沸しザイモリエースを完全に失活させた。その後、100 $\mu$ lをソモジーネルソン法に供し還元糖測定を行い、残りの溶液は高速液体クロマトグラフィー (HPLCカラム: TSK-Gel G5000PWXL + G3000PWXL, PolyspherCHNA) に供してオリゴ糖について分析した。各反応系に於ける全糖量を100として各時間のオリゴ糖量を算出し、分解率とした。結果を図3に示す。図3より、比較例の反応系に於いては、殆どオリゴ糖が生成しない

のに対し、実施例1の反応系では5時間でほぼ80%が分解しオリゴ糖が効率よく生成することがわかる。また、HPLCチャートより比較例の反応系に於ては、殆ど分子量が変化しないのに対し、実施例1の反応系では1時間でその平均分子量は10万となっていることがわかる。

#### 【0011】実施例2

ザイモリエース-20T（生化学工業製）をキトパールBCW-3501（富士紡績製）にグルタルアルデヒドを介して固定化した固定化酵素をジャケット付きカラムに詰め、別に調製した実施例1と同様のアルカリ処理SPG溶液を空間速度；SV=0.5にて流し連続的に反応を行った。反応液からオリゴ糖生成と分解率を実施例1と同様にして算出した。また、カラム内の固定化酵素の残存活性を測定するため繰り返し反応を行い分解率を算出した。その結果、オリゴ糖については生成率が多少低下するものの残存活性の半減期（50%）になるには実施例1のバッチ方式と比較して10倍以上の基質を処理できることを確認した。

#### 【0012】実施例3

シゾフィリウム・コミュニケーション培養ブロスから遠心分離除去した菌体250gに0.5N水酸化ナトリウム水溶液250mlを加え攪拌後1N塩酸にてpH7に調製した。これにザイモリエース-20T（生化学工業製）5mgを加え溶解し45℃にて10時間反応を行った。反応液を実施例1と同様にHPLC分析した結果、同様のオリゴ糖\*

\*を生成していることを確認した。

#### 実施例4

スクレログルカン1gを0.2N水酸化ナトリウム溶液20mlに完全に溶解させた。このスクレログルカン溶液を0.1N塩酸溶液40ml中に攪拌しながら添加し、添加後pH6に調整し全量を100mlとした。この溶液にザイモリエース-20T（生化学工業製）を2.5mg加え溶解し40℃～45℃で攪拌しながら10時間反応させた。生成したオリゴ糖をHPLC分析により確認したところシゾフィランと比較してやや重合度の多いオリゴ糖が生成していることを確認した。

#### 【0013】実施例5

上記の方法により調製した低分子量分岐β-1, 3-グルカンの抗腫瘍効果を次のようにして測定した。すなわち、対照群および試料投与群それぞれ10匹ずつのマウスに、Sarcoma 180腫瘍細胞 $2 \times 10^6$ 個を皮下に移植し、24時間後に対照群には生食水を、試料投与群には10mg/kg-マウス体重の投与量になるように調製した試料生食水溶液をそれぞれ0.05mlずつ筋注した。腫瘍移植後31日後の腫瘍重量を測定し、以下の式によって抑制率を求めた。

$$\text{抑制率 (\%)} = [1 - (\text{試料投与群の平均腫瘍重量 (g)} / (\text{対照群の平均腫瘍重量 (g)})] \times 100$$

結果を表-1に示す。

#### 【0014】

#### 【表1】

表-1

試料 M.W. $\times 10^4$	腫瘍重量	抑制率	完全後退
5.0 酵素	0.45 ( $\pm 0.29$ )	87.3	7/10
2.0	1.81 ( $\pm 0.56$ )	49.4	4/10
5.5 ソニック	0.75 ( $\pm 0.85$ )	79.0	4/10
2.5	3.57 ( $\pm 1.73$ )	0.17	2/10
PBS コントロール	3.58 ( $\pm 0.53$ )	—	0/10
45.0	0.01 ( $\pm 0.02$ )	99.6	9/10

#### 【0015】実施例6

シゾフィラン1gに水20mlを加え耐圧耐熱のステンレス製容器に入れ140℃の恒温機に1時間放置した後、これにpH6のリン酸緩衝液1mlとザイモリエース-20Tを2.5mg加えて溶解し40～45℃で10時間、振盪反応させた。10時間後、HPLC分析により、実施例1と同様のオリゴ糖を生成していることを確認した。また未分解の多糖も、低分子量であることを確認した。

#### 【0016】

【発明の効果】エンドタイプの加水分解酵素では、従来殆ど反応しなかった分岐β-1, 3-グルカンを、本発明の方法によればその高次構造を変化させることにより80%以上の分解率で分解することができた。この方法によって、従来の低分子化方法によっては得ることがで

きなかった3重らせん構造を保持した低分子量のβ-1, 3-グルカンを短時間で効率よく得ることが出来た。また、この反応で生成する分岐ラナミオリゴ糖は有機合成等の手法では得ることの困難な特殊な構造を有しているものも高収率で得られた。これら低分子量の分岐β-1, 3-グルカンおよび分岐ラミナリオリゴ糖やそれらの誘導体の生理的性質として、例えば抗腫瘍作用、抗エイズ作用、ファイトアレキシンのエリシター活性、整腸作用、酵素阻害活性等が考えられ、今後医薬品や機能性食品としての用途が期待される。また、これまで行なわれていない分岐β-1, 3-グルカンのオリゴ糖レベルからの物性、構造、生化学等の基礎的研究の発展に寄与することが期待できる。

#### 【0017】

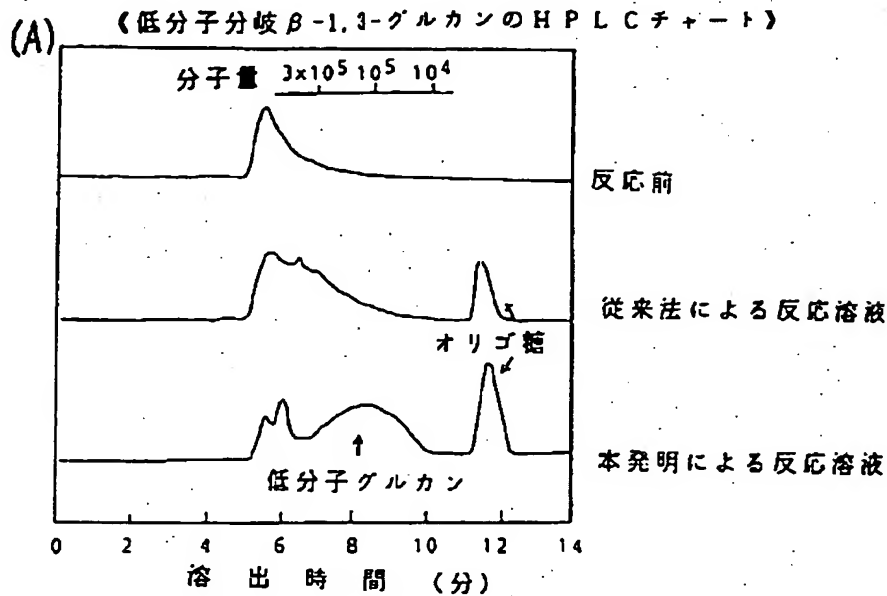
【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の方法により製造した低分子量分岐 $\beta$ -1,3-グルカン及びオリゴ糖のHPLCチャートを示す。

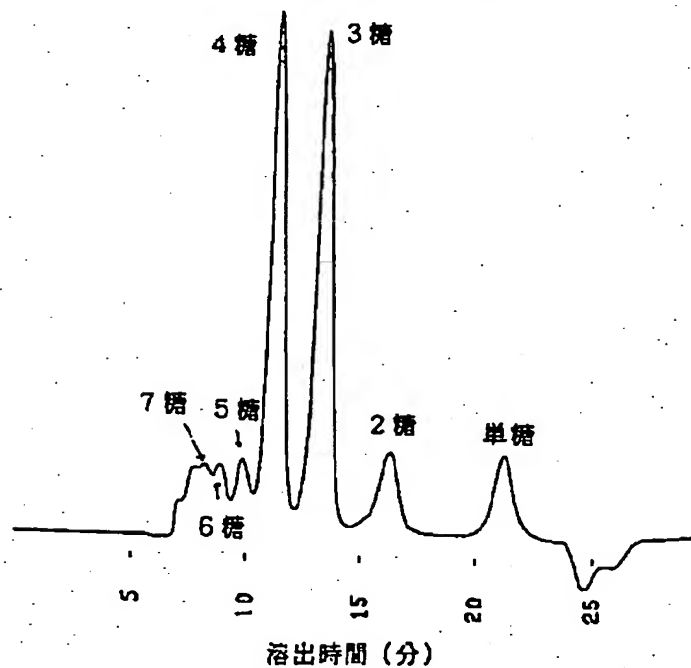
【図2】 本発明の方法により製造した分岐ラミナリオリゴ糖を構成する糖の構造式を示す。

【図3】 本発明の方法における酵素の作用時間による分岐 $\beta$ -1,3-グルカンの分解率を示す。

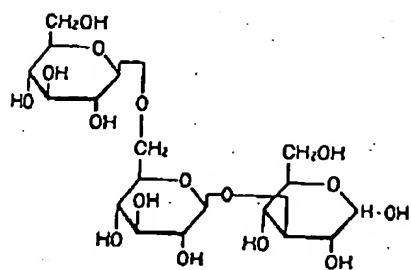
【図1】



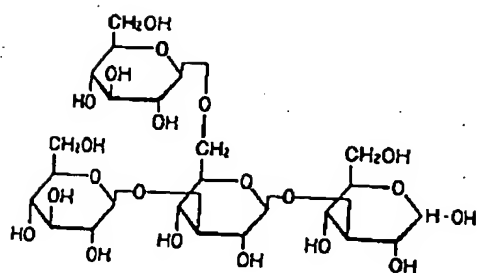
(B) (分岐オリゴ糖画分のHPLCチャート)



【図2】



3 糖



4 糖

【図3】

